转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜的杀虫剂敏感性及解毒酶系的影响

张炬红[1],郭建英[1],万方浩[1,*],夏敬源[2]

(1. 中国农业科学院植物保护研究所,植物病虫害生物学国家重点实验室,北京 100094;
2. 农业部全国农业技术推广与服务中心,北京 100026)

摘要:采用浸叶法,以亲本常规棉作对照,室内测定了吡虫啉和辛硫磷对在转 Bt 基因棉上取食不同世代棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 的毒力,并用酶标仪测定了转 Bt 基因棉对棉蚜酯酶、羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶活力的影响。结果表明,棉蚜对吡虫啉和辛硫磷的敏感性并未受 Bt 棉的影响,2 种杀虫剂对分别取食 Bt 棉 1 代和多代(60 代以上)的棉蚜与取食亲本常规棉棉蚜的 LC_{50} 值之间均无显著差异。在抗虫棉 GK12 上取食 1 代和 21 代的棉蚜,其酯酶、羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的活力与取食亲本常规棉的棉蚜之间差异不显著。可见,转 Bt 基因棉对棉蚜的杀虫剂敏感性和解毒酶活力无显著影响。

关键词:转 Bt 基因棉;棉蚜;杀虫剂敏感性;解毒酶;乙酰胆碱酯酶

中图分类号:Q965 **文献标识码**:A **文章编号**:0454-6296(2006)06-0938-06

Effects of transgenic Bt cotton on the susceptibility to insecticides and detoxification enzyme activities of cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover)

ZHANG Ju-Hong[1], GUO Jian-Ying[1], WAN Fang-Hao[1,*], XIA Jing-Yuan[2] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. National Agro-Technical Extension and Service Center, Ministry of Agriculture, Beijing 100026, China)

Abstract: The toxicities of imidacloprid and phoxim against cotton aphids fed on transgenic Bt cotton for different generations were measured by leaf-dip bioassay in the laboratory and compared with those on parental cotton variety. Activities of esterase, carboxylesterase and acetylcholinesterase of cotton aphids fed on Bt cotton were detected with microtiter plate reader. The results indicated that the susceptibility of cotton aphids to either imidacloprid or phoxim was not affected by Bt cotton. For both kinds of insecticides, there was no significant difference of LC_{50} among cotton aphids fed on Bt cotton for 1 generation, on Bt cotton for over 60 generations, and on parental cotton continuously. For all three detoxification enzymes tested, there was no significant difference of enzyme activities among cotton aphids fed on Bt cotton for 1 and 21 generations, and those on parental cotton. It was so concluded that transgenic Bt cotton had no significant effects on the susceptibility to insecticides and detoxification enzyme activities of cotton aphids.

Key words: Transgenic Bt cotton; *Aphis gossypii*; insecticide susceptibility; detoxification enzyme; acetylcholinesterase

棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 是我国南北棉区重要害虫之一,主要吸食韧皮部汁液内的营养物质,同时也是许多植物病毒的携带者,其排泄的蜜露污染棉花叶片可引起霉污病,并影响植物光合作用,造成棉叶卷缩成团、棉苗发育延迟、根系发育不良,甚至引起棉铃脱落等(张广学和钟铁森,1983)。转 Bt 基因

基金项目:国家重点基础研究发展规划"973"项目(2002CB111400);国家"十五"科技攻关重大项目(2004BA516A01);欧盟项目(ICA4-CT-2001-10069)

作者简介:张炬红,女,1977 年生,河北秦皇岛人,博士研究生,主要从事转基因抗虫植物生态风险评价,E-mail:zhangjuhong2000@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail:wanfangh@public3.bta.net.cn

收稿日期 Received:2006-04-07;接受日期 Accepted:2006-07-14

抗虫棉是利用分子生物学技术将外源苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*,Bt)转入棉花体内,提高棉花对鳞翅目害虫的抗性(谢道昕等,1991)。作为一种非目标害虫,棉蚜在转 Bt 基因棉上的危害仍很严重,(崔金杰和夏敬源,1999;Men *et al*., 2003),在蚜害高峰期必须施用杀虫剂才能减少棉蚜的危害。目前有关转 Bt 基因棉上棉蚜杀虫剂敏感性是否发生变化还未见报道,但是了解转 Bt 基因棉对棉蚜杀虫剂敏感性的影响,才能有针对性地对其采取综合防治措施,并利于转 Bt 基因棉的深入推广和使用。在害虫取食植物的过程中,一方面植物依靠各种具有防卫作用的次生性代谢产物,通过影响害虫的取食行为或正常生理来抵御害虫侵害;另一方面害虫又能通过改变自身的解毒酶或靶标酶的特性等多种途径不断地适应寄主植物体内的次生代谢产物(李飞等,2002)。解毒酶对植食性昆虫的生长和生存非常重要,解毒酶系的变异是昆虫取食适应性的最重要形式之一(谢佳燕等,2000),解毒酶的变化可能改变其对杀虫剂的敏感性(Wood *et al*., 1981; Loganathan and Gopahn, 1985)。本文旨在研究取食 Bt 棉的棉蚜对常用杀虫剂中的烟碱类和有机磷类杀虫剂的敏感性,及其体内解毒酶的变化,以期为转 Bt 基因棉上棉蚜的防治提供基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　棉花品种及种植:单价转基因抗虫棉 GK12,所转基因为 Cry1Ab/Ac 融合基因,由山东省梁山县棉花种子有限公司提供;GK12 的亲本泗棉 3 号,由江苏省泗阳棉花原总场提供。以上两种棉花品种均播种在黑色塑料营养钵(10 cm × 10 cm)中,钵中为跖石∶营养土∶普通土 = 1∶1∶1 的混合土,在温室(25℃ ~ 29℃,RH 65% ~ 90%,24 h 光照)培育,定期浇水、人工除虫。

1.1.2　供试昆虫:在温室常规棉上采集初产棉蚜若蚜,分别用常规棉泗棉 3 号和 GK12 在温室饲养保种(25℃ ~ 29℃,RH 65% ~ 90%,24 h 光照)。两种群均维持 60 代以上,以研究转 Bt 基因棉对棉蚜的长期作用。

1.1.3　供试杀虫剂:10%吡虫啉可湿性粉剂,属新烟碱类内吸性杀虫剂,江苏常隆化工有限公司生产;40%辛硫磷乳油,属有机磷类胃毒性杀虫剂,江苏宝灵化工股份有限公司生产。

1.1.4　供试药品:α-乙酸萘酯(α-NA)、α-萘酚、毒扁豆碱、固蓝 B、十二烷基硫酸钠(SDS)、5,5′-二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝、Triton X-100,均购自 Sigma 公司。碘化硫代乙酰胆碱(ATChI)、固蓝 RR,Fluka 公司产品。丙酮,磷酸二氢钠,磷酸氢二钠,均为分析纯,北京化学试剂公司产品。

1.2　方法

1.2.1　毒力测定:采用 Busvine(1980)浸叶法。通过预试验确定使棉蚜死亡率达 10% ~ 90% 的杀虫剂的 6 种浓度(等比稀释)为试验浓度。

采集转 Bt 基因棉 GK12 及其亲本泗棉 3 号 3 ~ 4 叶期的棉花叶片,浸入指定浓度的杀虫剂中 30 s 后,反面朝上放在高 15 mm 的塑料培养皿内(内铺厚约 10 mm 的 1%琼脂培养基),放在通风的地方使叶片自然干燥。然后将在 GK12 上分别取食 1 代和多代(60 代以上)的无翅成蚜用软毛笔接在棉花叶片上,每叶片 15 头,并用同样大小的培养皿盖在上面,防止棉蚜逃逸。每浓度梯度设 4 个叶片,每浓度重复 3 次,并用浸水的叶片作为对照。然后将培养皿放在温度 25℃,24 h 光照,相对湿度 60% ~ 70% 的养虫室内,调查棉蚜在 48 h 内的死亡率,棉蚜的死亡以用软毛笔轻触时其不能用两条以上的足运动时计(Li and Han,2004)。计算毒力回归曲线的斜率 b 值以及杀虫剂对棉蚜的 LC_{50}。

1.2.2　解毒酶系测定中供试棉蚜的采集:在温室种植转 Bt 基因抗虫棉 GK12 及其亲本泗棉 3 号,待棉花长到 2 ~ 3 叶期时将常规棉上饲养的成蚜分别接到两种棉花的叶片上,12 h 内清除成蚜,留下初产若蚜。此后,分别收集在两种棉花上连续取食 1 代和 21 代的棉蚜成蚜,放在 -20℃冰箱保存,用来测定棉蚜的解毒酶活力。

1.2.3　酶源制备:将收集的成蚜用毛笔单头挑出,转移到放在冰块上的封口膜上,然后用 PCR 管的底部研磨,磨碎后加入 10 μL 的磷酸缓冲液(乙酰胆碱酯酶为 0.02 mol/L pH 7.2,酯酶为 0.1 mol/L pH 7.0,羧酸酯酶为 0.02 mol/L pH 7.0,均含有 0.1% (V/V) Triton X-100)再次研磨,然后将样品用移液器转移到新的 PCR 管内,用 20 μL 的缓冲液冲洗封口膜和转移酶液的枪头,并转移到 PCR 管内。在 4℃,12 000 r/min 下离心 15 min,取上清液作为酶源。

1.2.4　酶活力测定:(1)乙酰胆碱酯酶:在酶标板加样孔中依次加入 2 μL 酶液、48 μL 0.02 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液、50 μL DTNB 溶液和 50 μL ATChI

溶液。DTNB 和 ATChI 的反应浓度分别为 45 μmol/L 和 15 mmol/L。在 25℃，415 nm 下用酶标仪（BIO-RAD Model 680，下同）检测酶活力，每隔 30 s 读取 OD 值一次，共记录 10 个 OD 值。每个处理 30 头虫，整个试验重复 3 次（李飞等，2003；Li and Hau，2004）。根据摩耳消光系数计算乙酰胆碱酯酶的酶活力和比活力。消光系数为：1.36×10^4 L·mol^{-1}·cm^{-1}。

（2）酯酶：采用酶标仪动力学方法测定酯酶活力（Han *et al*.，1998）。取 2 μL 酶源上清液加在 96 孔酶标板的酶标孔内相应位置，将含有 1.5 mmol/L 固蓝 RR 的磷酸盐缓冲液过滤，加入含有 α-NA 的丙酮溶液，使底物最后的浓度为 1 mmol/L，将 108 μL 的底物缓冲液加入酶液中并迅速混合，在酶标仪 450 nm 波长下测定酯酶活力。每 30 s 读取 OD 值一次，共记录 10 个 OD 值。每个处理测定 25 头棉蚜，整个试验重复 3 次。以 α-萘酚绘制标准曲线，根据各个样品的 OD_{450} 的斜率计算样品中所含的 α-萘酚，再除以样品中所含的蛋白质含量，即为棉蚜酯酶的比活力，单位为 μmol/（mg·min）。

（3）羧酸酯酶：以 α-NA 为底物，用酶标仪终点法测定羧酸酯酶活性。在酶标板上依次加入 18 μL 磷酸缓冲液、2 μL 酶液、72 μL α-NA（3×10^{-4} mol/L，含有 1% 丙酮和 0.03 mol/L 毒扁豆碱）和 20 μL 固蓝 B（1%）和 SDS（5%）的混合液（V∶V = 2∶5）。然后在酶标仪 595 nm 下测定羧酸酯酶活力。每个处理测定 25 头棉蚜，整个试验重复 3 次。根据样品的 OD 值和 α-萘酚标准曲线以及样品内蛋白含量计算样品的酸酸酯酶活力和比活力。

1.2.5 米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 测定：将所测定的酶底物稀释成 6 个浓度梯度（乙酰胆碱酯酶：0.045，0.06，0.09，0.012，0.015，0.018 mmol/L 的 ATChI；酯酶和羧酸酯酶：0.1，0.15，0.2，0.25，0.3 和 0.35 mmol/L 的 α-NA），采用终点法测定 3 种酶的活性（其他步骤同上），整个试验重复 3 次。用双倒数法计算各酶的 K_m 和 V_{max}。

1.2.6 酶源蛋白含量测定：采用考马斯亮蓝（Bradford，1976）法，以牛血清白蛋白为标准蛋白，绘制标准曲线，测定各处理样品酶源在酶标仪 595 nm 下的光密度值，根据标准曲线计算各处理棉蚜匀浆上清液的蛋白含量。

1.3 统计分析方法

取食常规棉泗棉 3 号和 GK12 不同世代棉蚜对两种杀虫剂的 LC_{50} 以及取食不同棉花品种和世代棉蚜的酯酶、羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶间的差异显著性均采用单因素方差分析（One Way ANOVA：LSD test）进行比较，以上数据分析采用 SPSS 处理软件进行。

2 结果与分析

2.1 转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜杀虫剂敏感性的影响

与取食泗棉 3 号的对照相比，取食转 Bt 基因抗虫棉的棉蚜对吡虫啉和辛硫磷的敏感性未发生变化（表 1）。吡虫啉对在 GK12 上取食 1 代和多代（60 代以上）棉蚜的杀虫效果没有差异，对在 GK12 上取食多代棉蚜的 LC_{50} 为 0.013 ± 0.004 mg/mL，对取食 1 代的棉蚜为 0.005 ± 0.002 mg/mL，但通过差异显著性比较分析，并未达到显著水平。同时，吡虫啉对取食 Bt 棉 GK12 的棉蚜与取食亲本常规棉泗棉 3 号棉蚜的 LC_{50} 差异不显著，可见棉蚜对吡虫啉的敏感性并未受到 Bt 毒蛋白的显著影响。取食 Bt 抗虫棉后，棉蚜对辛硫磷的敏感性也没有发生变化（表 1），辛硫磷对在 Bt 棉上取食 60 代以上棉蚜的 LC_{50} 比取食 1 代的低，但并未达到显著水平。与亲本泗棉 3 号上的棉蚜相比，在 GK12 上取食的棉蚜 LC_{50} 偏高，但差异未达到显著水平。

表 1 取食转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜杀虫剂敏感性的影响

Table 1 Effects of transgenic Bt cotton on the susceptibility of cotton aphids to insecticides

杀虫剂 Insecticides	棉花品种 Cotton variety	取食代数 Generations fed on cotton	斜率 *b* 值 Slope *b* value	LC_{50} (mg/mL)
吡虫啉 Imidacloprid	泗棉 3 号 Simian 3	1 代 One generation	1.615 ± 0.228 a	0.013 ± 0.002 a
	GK12	1 代 One generation	1.701 ± 0.591 a	0.005 ± 0.002 a
	GK12	多代 Over 60 generations	1.842 ± 0.157 a	0.013 ± 0.004 a
辛硫磷 Phoxim	泗棉 3 号 Simian 3	1 代 One generation	1.97 ± 0.26 a	0.71 ± 0.34 a
	GK12	1 代 One generation	1.65 ± 0.64 a	1.00 ± 0.01 a
	GK12	多代 Over 60 generations	1.82 ± 0.29 a	0.83 ± 0.44 a

注 Notes：表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误，同列数字后相同的小写字母表示差异不显著（$P > 0.05$）。The data in the table indicate mean ± *SE*；means in the same column followed by the same letters at lowercase do not differ significantly ($P > 0.05$). 下同 The same below.

2.2　转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜乙酰胆碱酯酶的影响

2.2.1　转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜乙酰胆碱酯酶比活力的影响：在泗棉 3 号和 GK12 上饲养 1 代的棉蚜个体内蛋白含量之间存在差异(表 2)，但乙酰胆碱酯酶活力和比活力之间无显著差异，蛋白含量之间的差异可能是由棉蚜的寄主转移造成的。在泗棉 3 号和 GK12 上取食 21 代的棉蚜在蛋白含量、乙酰胆碱酯酶活力和比活力之间无显著差异，GK12 上取食 1 代和 21 代的棉蚜相比，取食 1 代棉蚜的乙酰胆碱酯酶比活力为 0.019 ± 0.004 μmol/(mg· min)，大于取食 21 代棉蚜(0.013 ± 0.003)，但未达到显著水平。

表 2　取食转 Bt 基因棉对棉蚜乙酰胆碱酯酶活力

Table 2　Effects of transgenic Bt cotton on the acetylcholinesterase (AChE) activities of cotton aphids

棉花品种 Cotton variety	取食代数 Generations fed on cotton	蛋白含量 Protein content (mg/L)	酶活性 AChE activity [μmol/(min·mL)]	酶比活力 AChE specific activity [μmol/(mg·min)]
泗棉 3 号 Simian 3	1	225.96 ± 16.08 a	0.0016 ± 0.0005 a	0.015 ± 0.005 a
GK12	1	172.26 ± 10.85 b	0.0025 ± 0.0004 a	0.019 ± 0.004 a
泗棉 3 号 Simian 3	21	298.05 ± 16.49 c	0.0032 ± 0.0016 a	0.015 ± 0.008 a
GK12	21	264.10 ± 18.26 ac	0.0021 ± 0.0002 a	0.013 ± 0.003 a

2.2.2　转基因抗虫棉对棉蚜乙酰胆碱酯酶 K_m 和 V_{max} 的影响：在 GK12 上取食 1 代和 21 代的棉蚜分别和在泗棉 3 号上取食 1 代和 21 代的棉蚜相比，单头成蚜的乙酰胆碱酯酶最大反应速度 V_{max} 和米氏常数 K_m 之间无显著差异；同时，在 GK12 上取食 1 代和 21 代的棉蚜，单头成蚜的乙酰胆碱酯酶 K_m 和 V_{max} 之间也无显著差异(表 3)。由此可见，转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜个体的乙酰胆碱酯酶活力和与底物亲和力均无显著影响。

表 3　取食转 Bt 基因棉棉蚜的乙酰胆碱酯酶 K_m 和 V_{max}

Table 3　Effects of transgenic Bt cotton on the AChE V_{max} and K_m of cotton aphids

棉花品种 Cotton variety	取食代数 Generations fed on cotton	V_{max}	K_m
泗棉 3 号 Simian 3	1	2.39 ± 0.36 a	0.34 ± 0.12 a
GK12	1	2.78 ± 0.48 a	0.33 ± 0.09 a
泗棉 3 号 Simian 3	21	2.44 ± 0.25 a	0.36 ± 0.04 a
GK12	21	4.69 ± 0.14 a	0.39 ± 0.06 a

2.3　转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜酯酶的影响

在 GK12 上取食 1 代的棉蚜，单头成蚜蛋白含量和羧酸酯酶的活力与在泗棉 3 号上取食的棉蚜之间无显著差异，酯酶比活力分别为 0.034 ± 0.002 μmol/(mg·min) 和 0.037 ± 0.003 μmol/(mg·min)，无显著差异，可见在转 Bt 基因抗虫棉上取食 1 代对棉蚜的酯酶活力无显著影响。在 GK12 上取食 21 代的棉蚜，其单头成蚜蛋白含量、酯酶活力及比活力也与在对照常规棉上取食的棉蚜无显著差异(表 4)，表明即使在 Bt 棉上连续取食 21 代，棉蚜的酯酶活力也未受到显著影响。此外，在 GK12 上取食 21 代的棉蚜与取食 1 代的棉蚜之间酯酶活力无显著差异(表 4)。

2.4　转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜羧酸酯酶的影响

2.4.1　转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜羧酸酯酶比活力的影响：在 GK12 上取食 1 代的棉蚜，单头成蚜羧酸酯酶活力、蛋白含量以及羧酸酯酶比活力与取食泗棉 3 号的棉蚜(对照)无显著差异；但是在 GK12 上取食 21 代的棉蚜，单头成蚜羧酸酯酶活力低于在泗棉 3 号上取食的棉蚜，且差异显著，然而蚜虫体内蛋白含量和羧酸酯酶比活力与对照无显著差异(表 5)。在 GK12 上取食 1 代和 21 代的棉蚜，羧酸酯酶比活力差异不显著(表 5)。

表 4　取食转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜酯酶活力的影响

Table 4　Effects of transgenic Bt cotton on the esterase activities of cotton aphids

棉花品种 Cotton variety	取食代数 Generations fed on cotton	蛋白含量 Protein content (mg/L)	酯酶活性 Esterase activity [nmol/(min·mL)]	酯酶比活力 Esterase specific activity [μmol/ (mg·min)]
泗棉 3 号 Simian 3	1	211.56 ± 7.88 a	6.89 ± 0.35 a	0.037 ± 0.003 a
GK12	1	198.65 ± 7.12 a	6.29 ± 0.34 a	0.034 ± 0.002 a
泗棉 3 号 Simian 3	21	190.38 ± 11.47 a	6.38 ± 0.40 a	0.040 ± 0.004 a
GK12	21	187.06 ± 9.28 a	7.16 ± 0.42 a	0.042 ± 0.003 a

表 5 取食转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜羧酸酯酶活力的影响

Table 5 Effects of transgenic Bt cotton on the carboxylesterase activities of cotton aphids

棉花品种 Cotton variety	取食代数 Generations fed on cotton	蛋白含量 Protein content (mg/L)	羧酸酯酶活力 Carboxylesterase activity [μmol /(min·mL)]	羧酸酯酶比活力 Carboxylesterase specific activity [mmol /(mg·min)]
泗棉 3 号 Simian 3	21	131.58 ± 5.83 a	0.34 ± 0.10 a	0.0038 ± 0.0012 a
GK12	1	148.22 ± 5.50 a	0.34 ± 0.09 a	0.0025 ± 0.0007 a
GK12	21	131.71 ± 7.49 a	0.27 ± 0.05 b	0.0027 ± 0.0008 a

2.4.2 转基因抗虫棉对棉蚜羧酸酯酶 V_{max} 和 K_m 的影响：与取食泗棉 3 号的棉蚜相比，在 GK12 上取食 1 代和 21 代棉蚜羧酸酯酶的 K_m 没有显著差异（表 6），说明在泗棉 3 号和 GK12 上饲养的棉蚜与底物 α-NA 的亲和力差异不显著。此外，三者之间羧酸酯酶的 V_{max} 也无显著差异，说明转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜成蚜个体羧酸酯酶活性没有影响。

表 6 取食转 Bt 基因抗虫棉棉蚜的羧酸酯酶 V_{max} 和 K_m

Table 6 Effect of transgenic Bt cotton on the carboxylesterase V_{max} and K_m of cotton aphids

棉花品种 Cotton variety	取食代数 Generations fed on cotton	V_{max}	K_m
泗棉 3 号 Simian 3	21	1.15 ± 0.13 a	0.0015 ± 0.0005 a
GK12	1	1.40 ± 0.26 a	0.0019 ± 0.0003 a
GK12	21	1.88 ± 0.54 a	0.0013 ± 0.0003 a

3 讨论

棉蚜对杀虫剂的抗药性主要与代谢抗性和靶标抗性有关（艾颖等，2003）。代谢抗性是由于解毒酶的作用而降低杀虫剂的杀虫效应，酯酶是棉蚜解毒酶中的重要一种，在对有机磷杀虫剂抗性中起着重要的作用 在棉蚜靶标抗性中研究最多的是乙酰胆碱酯酶，乙酰胆碱酯酶是有机磷或氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标，乙酰胆碱酯酶敏感性的降低可以导致棉蚜对这两种杀虫剂的敏感性发生变化（Moores *et al*.，1996；Han *et al*.，1998）。在本研究中，取食转 Bt 基因抗虫棉 GK12 1 代和多代（60 代以上）的棉蚜对杀虫剂的敏感性未发生变化，吡虫啉和辛硫磷对取食 Bt 棉 GK12 和对照棉泗棉 3 号棉蚜的致死中浓度 LC_{50} 之间均无显著差异。进一步研究表明，与取食常规棉的对照相比，在转 Bt 基因棉上取食 1 代和 21 代，对棉蚜的酯酶、羧酸酯酶及乙酰胆碱酯酶的活力均无影响，同时对酯酶和乙酰胆碱酯酶的最大反应速度 V_{max} 和米氏常数 K_m 也无显著影响，说明酯酶和乙酰胆碱酯酶的化学性质和对底物的亲和力未发生变化。因此，杀虫剂抗性和解毒酶活性这两方面的结果是一致的。其原因在于昆虫体内的生理生化机制的变异是导致害虫对杀虫剂产生抗药性的机制之一，其生理生化机制变异的程度决定着昆虫的抗性水平（谢佳燕等，2000），昆虫解毒作用增加、代谢加速与昆虫抗性密切相关（唐振华，1993）。代谢杀虫剂的解毒酶使进入体内有毒的化学物质经过氧化、还原或水解后增强其产物的水溶性，易于排出体外，从而达到解毒的目的（李飞等，2001）。在乙酰胆碱酯酶活力测定中，取食 GK12 和取食泗棉 3 号 1 代的棉蚜，单头成蚜体内蛋白含量差异显著，但是酶活力和比活力差异不显著，可能是由棉蚜的寄主转移造成的。此外，在乙酰胆碱酯酶和酯酶的测定中，在常规对照棉泗棉 3 号上取食 1 代和 21 代的棉蚜以上两种酶的比活力无显著差异，因此在酸酸酯酶活力测定时只以在泗棉 3 号上取食 21 代的棉蚜为对照。

棉蚜在黄河、长江流域及华南棉区一年可发生 20 ~ 30 代。尽管本研究结果表明，与对照相比，在温室转 Bt 基因抗虫棉上连续取食 60 代以上的棉蚜对杀虫剂的敏感性未显著变化，取食 Bt 棉 21 代的棉蚜解毒酶活性也未显著变化，但由于转 Bt 基因抗虫棉中 Bt 蛋白的表达及 Bt 棉中植物次生代谢物的含量均受多种因素影响（Sachs *et al*.，1998；Chen *et al*.，2004），Bt 棉对棉蚜的影响是多因素综合作用的结果，Bt 棉是否通过其他直接或间接途径影响棉蚜的发生，尚需进一步研究。此外，棉蚜有转主寄生的习性，因此，在田间转 Bt 基因抗虫棉对棉蚜杀虫剂敏感性的实际影响状况仍需要进一步的证实和长期监测。

参 考 文 献 (References)

Ai Y，Qiu XH，He FQ，2003. A review of insecticides resistance mechanism *Aphis gossypii*. *Entomological Knowledge*，40 (5)：385 – 391. [艾颖，邱星辉，何凤琴，2003. 棉蚜抗药性机理研究进展. 昆虫知识，40 (5)：385 – 391]

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry

binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 – 254.

Busvine JR, 1980. Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides. FAO Plant Production and Protection Paper 21.

Chen DH, Ye GY, Yang CQ, Chen Y, Wu YK, 2004. Effect after introducing *Bacillus thuringiensis* gene on nitrogen metabolism in cotton. *Field Crops Research*, 87: 235 – 244.

Cui JJ, Xia JY, 1999. Effect of transgenic Bt cotton on the structure and composition of insect community. *Acta Agriculturae Universitatis Henanensis*, 33(4): 342 – 345. [崔金杰,夏敬源,1999. 转 Bt 基因棉对昆虫群落结构与组成的影响. 河南农业大学学报,33(4): 342 – 345]

Han ZJ, Moores GD, van Denholm, Devonshire AL, 1998. Association between biochemical markers and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 62: 164 – 171.

Li F, Han ZJ, 2004. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 397 – 405.

Li F, Han ZJ, Tang B, 2003. Insensitivity of acetylcholinesterase and increased activity of esterase in the resistant cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Acta Entomologica Sinica*, 46 (5): 578 – 583. [李飞,韩召军,唐波,2003. 抗性品系棉蚜乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶的变异. 昆虫学报,46 (5): 578 – 583]

Li F, Han ZJ, Wu ZF, 2002. Comparison of esterase and acetylcholinesterase of cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover reared on deferent host plants. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 25(2): 57 – 60. [李飞,韩召军,吴智锋,2002. 取食不同寄主棉蚜的羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶特性比较. 南京农业大学学报,25(2): 57 – 60]

Li F, Han ZJ, Wu ZF, Wang YC, 2001. Insecticide resistance of *Aphis gossypii* Glover in cotton in China. *Cotton Science*, 13(2): 121 – 124. [李飞,韩召军,吴智锋,王荫长,2001. 我国棉蚜抗药性研究现状. 棉花学报,13(2): 121 – 124]

Loganathan M, Gopahn M, 1985. Effect of host plants on the susceptibility of *Heliothis armigera* Hübner to insecticides. *Indian J. Plant Prot.*, 13: 1 – 4.

Men XY, Ge F, Liu XH, Yardim EN, 2003. Diversity of arthropod communities in transgenic Bt cotton and nontransgenic cotton agroecosystems. *Environ. Entomol.*, 32(2): 270 – 275.

Moores GD, Gao XW, Denholm I, Devonshire AL, 1996. Characterisation of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 56: 102 – 110.

Sachs ES, Benedict JH, Stelly DM, Taylor JF, Altman DW, Berberich SA, Davis SK, 1998. Expression and segregation of genes encoding Cry1A insecticidal proteins in cotton. *Crop Science*, 38: 1 – 11.

Tang ZH, 1993. Insect Resistance to Insecticides and Its Management. Beijing: China Agriculture Press. 221 pp. [唐振华, 1993. 昆虫抗药性及其治理. 北京: 农业出版社. 221 页]

Wood KA, Wilson BH, Graves JB, 1981. Influence of host plant on susceptibility of the fall armyworm to insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 74: 96 – 98.

Xie DX, Fan YL, Ni WC, Huang JQ, 1991. Obtaining transgenic cotton plants by introducing *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins gene. *Science in China* (*Series B*), 4(2): 367 – 373. [谢道昕, 范云六,倪万潮,黄俊麒,1991. 苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株. 中国科学(B 辑),4(2): 367 – 373]

Xie JY, He FQ, Feng GL, 2000. A 96-well microplate reader for measuring characterization of esterase and insecticide resistance in the cotton aphids (*Aphis gossypii* Glover). *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2(1): 47 – 52. [谢佳燕,何凤琴,冯国蕾,2000. 微量滴度酶标板法测定棉蚜(*Aphis gossypii* Glover)酯酶特性与有机磷抗性的关系. 农药学学报,2(1): 47 – 52]

Zhang GX, Zhong TS, 1983. Economic Insect Fauna of China. Fasc. 25. Beijing: Science Press. 233. [张广学,钟铁森,1983. 中国经济昆虫志. 第二十五册. 北京: 科学出版社. 233]

(责任编辑: 黄玲巧)